王道滇, 杨星莹, 文娜, 等. 基于分子对接和网络药理学方法研究桑叶中的新型 α-葡萄糖苷酶抑制肽 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(12): 95−106. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060134
WANG Daodian, YANG Xingying, WEN Na, et al. Novel α-Glucosidase Inhibitory Peptides from Mulberry Leaf Based on Molecular Docking and Network Pharmacology Approaches[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(12): 95−106. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060134

·研究与探讨·

基于分子对接和网络药理学方法研究桑叶中的新型 α-葡萄糖苷酶抑制肽

王道滇, 杨星莹, 文　娜, 崔　琛, 李金见, 李平平*, 杨　文*
（云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所, 云南蒙自 661101）

摘　要: 桑叶富含优质蛋白，是生物活性肽的潜在来源。本研究基于肽组学鉴定和活性肽的构效关系从桑叶蛋白酶解产物中鉴定新型的 α-葡萄糖苷酶抑制肽，并通过分子对接和网络药理学预测，解析新型 α-葡萄糖苷酶抑制肽的抗糖尿病机制。结果表明，ANSTGSRL（IC_{50}=0.314 mg/mL）和 LAKLLHSK（IC_{50}=0.183 mg/mL）两条新型的 α-葡萄糖苷酶抑制肽被鉴定。与 ANSTGSRL 相比，LAKLLHSK 表现出更高的 β-折叠结构含量和更低的 α-螺旋及无规卷曲结构含量。胃肠消化促进了两条肽 α-葡萄糖苷酶抑制活性的释放，对酶的抑制率超过 85%。分子对接分析表明，这两种肽通过多个氢键和疏水相互作用，紧密地结合到 α-葡萄糖苷酶的活性残基位点（Val335、Val334、Pro230 和 Gly228），从而发挥其 α-葡萄糖苷酶抑制活性。网络药理学预测表明，ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 两条肽能够与 MAPK1、CASP3、STAT1、ERBB2 和 AKT3 等 10 个关键靶点相互作用。此外，KEGG 通路富集显示这两条肽防治糖尿病的通路涉及 TNF 信号通路、cAMP 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路和胰岛素抵抗等多种复杂信号通路。综上，新型桑叶肽 ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 具有较强的 α-葡萄糖苷酶抑制活性和潜在的血糖调节作用，本研究可为桑叶蛋白资源的高附加值利用提供理论参考。

关键词: 桑叶, 肽, α-葡萄糖苷酶抑制活性, 分子对接, 网络药理学
中图分类号: S888　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)12−0095−12
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025060134
本文网刊:

Novel α-Glucosidase Inhibitory Peptides from Mulberry Leaf Based on Molecular Docking and Network Pharmacology Approaches

WANG Daodian, YANG Xingying, WEN Na, CUI Chen, LI Jinjian, LI Pingping*, YANG Wen*
（Sericulture and Apiculture Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Mengzi 661101, China）

Abstract: Mulberry leaves are a rich source of high-quality protein and possess the potential to yield bioactive peptides. This study identified novel α-glucosidase inhibitory peptides from mulberry leaf proteolytic products based on peptidomics identification and the structure-activity relationships of active peptides. Through molecular docking and network pharmacology predictions, the anti-diabetic mechanisms of these novel α-glucosidase inhibitory peptides were elucidated. The results indicated that two novel α-glucosidase inhibitory peptides were identified: ANSTGSRL (IC_{50}=0.314 mg/mL) and LAKLLHSK (IC_{50}=0.183 mg/mL). LAKLLHSK exhibited a higher content of β-sheet structure and a lower content of α-helix and random coil structures compared to ANSTGSRL. The gastrointestinal digestion process enhanced the release of α-glucosidase inhibitory activity for both peptides, achieving over 85% enzyme inhibition. Molecular docking analysis revealed that the two peptides tightly bound to the active residue sites of α-glucosidase (Val335, Val334, Pro230 and Gly228),

收稿日期: 2025−06−12
基金项目: 云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所青年创新基金项目（QC2025001）；向仲怀院士专家工作站（202305AF150166）；现代农业产业技术体系建设专项（CARS-18）。
作者简介: 王道滇（1997−）, 男, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 昆虫与植物蛋白研究, E-mail: 2545854465@qq.com。
*** 通信作者:** 李平平（1986−）, 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 植物资源评价与利用, E-mail: liping-1200@163.com。
杨文（1971−）, 男, 硕士, 研究员, 研究方向: 蚕桑资源综合利用研究与产品研发, E-mail: yw@yaas.org.cn。

primarily through multiple hydrogen bonds and hydrophobic interactions, thereby exerting their α-glucosidase inhibitory activity. Network pharmacology predictions indicated that two peptides, ANSTGSRL and LAKLLHSK, could interact with over ten key targets, including MAPK1, CASP3, STAT1, ERBB2 and AKT3. KEGG pathway enrichment analysis revealed that the anti-diabetic pathway associated with these peptides involves multiple complex signaling pathways, including the TNF, cAMP, PI3K-Akt, and MAPK pathways, as well as insulin resistance. In conclusion, the novel mulberry leaf peptides ANSTGSRL and LAKLLHSK exhibited strong α-glucosidase inhibitory activity and potential glucose regulation effects. This study could provide a theoretical reference for the high-value utilization of mulberry leaf protein resources.

Key words: mulberry leaves; peptide; α-glucosidase inhibitory activity; molecular docking; network pharmacology

糖尿病是全球增长率最快和最为普遍的慢性疾病之一，其主要特征是血液中葡萄糖水平的异常升高[1−2]。人体内的葡萄糖主要来源于 α-淀粉酶、DPP-IV 酶和 α-葡萄糖苷酶 3 种关键消化酶对碳水化合物的水解，通过抑制这些消化酶的活性有助于降低血液中游离葡萄糖的水平[2]。其中，不同于其他两种消化酶，α-葡萄糖苷酶主要存在于小肠上皮细胞刷状缘表面膜上，与其对应的 α-葡萄糖苷酶抑制剂可以在不被小肠吸收的情况下与之结合，从而快速地抑制碳水化合物的水解代谢，缓解餐后血糖的升高[3]。这种特性为肠道消化耐受性较差的口服类 α-葡萄糖苷酶抑制剂发挥生物效应提供了保障，这也是人们偏向于寻找 α-葡萄糖苷酶抑制剂治疗糖尿病的缘由。目前，考虑到长期注射胰岛素和口服阿卡波糖等 α-葡萄糖苷酶抑制剂药物可能会引发腹痛、肠道生态破坏和肝脏损伤等副作用[4]。因此，从天然物质中提取和开发无毒副作用、经济可行、环境友好的活性物质干预治疗糖尿病成为新的研究趋势[5]，而食源性 α-葡萄糖苷酶抑制肽因其成本低、安全性高、环境友好和具备较高的酶亲和力成为研究热点[6]。

桑（*Morus alba* L.）为桑科桑属落叶乔木或灌木，是一类重要的经济林木，在我国拥有广泛的种植区域[7−8]。桑叶是桑的主要产物，富含黄酮、生物碱、多酚类、维生素、甾醇类和多糖类等活性成分，具备抗氧化、降血糖和降血压等潜在功能，被我国卫生部列为药食两用的农产品，具有广阔的研究价值[7,9]。此外，桑叶粉中粗蛋白含量在 17%~35% 之间，含有 18 种氨基酸，种类齐全，动物性必需氨基酸占总氨基酸质量分数的 43%，不含胆固醇，是一类新型可再生的植物蛋白质资源[10−11]。然而，由于对桑叶的利用大多限于养蚕和饲用，更深层次的精加工和高附加值的利用极少，致使桑叶蛋白资源得不到有效利用。为了解决这一难题，部分研究者开展了桑叶蛋白及其衍生肽功能活性领域的相关研究。Chen 等[10] 和 Sun 等[12] 从桑叶蛋白酶解物中分别鉴定出 TELVLK、MELVLK、FDDKLD 和 EAVQ、SVL、RDYERFNVE 等降血压肽和抗氧化肽。降血糖方面，曹秀娟等[13] 发现桑叶蛋白水解液同时具有抗氧化活性、酪氨酸酶抑制活性和 α-葡萄糖苷酶抑制活性，抗消化特性较强。曹天丽等[7] 考察了不同蛋白酶对桑叶蛋白酶解物体外降血糖活性的影响，发现桑叶胰蛋白酶酶解物抑制 α-葡萄糖苷酶活性的 IC_{50} 值达到 5.65 mg/mL。冯雪等[14] 发现不同酶解条件制备的桑叶肽都具有维持血糖健康水平的作用，这进一步表明桑叶蛋白可能是血糖调节肽的潜在来源。然而，这些研究并未对桑叶蛋白酶解液中具体 α-葡萄糖苷酶抑制肽的序列组成和结构进行表征，肽的生物活性和作用机制也有待进一步明确。

基于此，本研究拟以桑叶为试验材料，通过提取蛋白和胃蛋白酶酶解制备桑叶肽，基于肽组学鉴定和生物信息分析挖掘新型的 α-葡萄糖苷酶抑制肽，探究肽的二级结构和胃肠耐受性，最后通过分子对接和网络药理学预测，解析新型 α-葡萄糖苷酶抑制肽的作用机制，旨在为桑叶优质蛋白资源的开发利用提供新视角。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

云桑二号桑叶　由云南省农业科学院蚕桑蜜蜂研究所提供；甲酸、乙腈、甲醇　德国默克股份两合公司；三氯乙酸、Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽标准品（HPLC≥96%）、对硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷（PNPG）、α-葡萄糖苷酶（700000 U/mL）　上海源叶生物科技有限公司；胃蛋白酶（695 U/mg）、胰蛋白酶（8×USP）、猪胆盐　美国 Sigma-aldrich 公司；实验所用其他实验试剂均为国产分析纯。

Millipore UFSC40001 型超滤装置　上海羽令过滤器材有限公司；210 HP 型超声波清洗器　上海科导公司；SCIENTZ-18N/A 型真空冷冻干燥机　上海比朗仪器制造有限公司；THZ-320 型台式恒温振荡器　金坛市精达仪器制造有限公司；Nano-HPLC 液相色谱仪　上海赛梵科分离技术有限公司；Spectra Max M 型酶标仪　美国 BIO-RADxMARKTM 公司；Sorvall ST 8R 型台式离心机、Easy-nLC 1000 型液相色谱仪、Q Exactive 型四极杆质谱仪、Nicolet 6700 型傅里叶变换红外光谱仪　赛默飞世尔科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1　桑叶肽的制备和肽含量测定　参照 Sun 等[15] 的方法稍作修改提取桑叶蛋白并制备桑叶肽。将经过鼓风干燥和超微粉碎后的桑叶粉与超纯水以 1∶15（w/v）的比例混合，用 1 mol/L NaOH 调节溶液 pH 至 9.0，超声波处理（50 Hz，40 ℃，40 min）和离心后得到

浸提液。用 1 mol/L HCl 调节浸提液的 pH 至等电点(pI=5.0)。进行离心(8000 r/min, 5 min)、超纯水洗涤后得到桑叶蛋白质沉淀物。随后，将冷冻干燥后的桑叶蛋白溶解于超纯水中(20%, w/v)中，调节 pH 至 2.0，加入 4%(w/w)胃蛋白酶，于 37 ℃ 下振荡孵育 2 h 后，用 1 mol/L NaOH调节反应液至中性，90 ℃ 环境中水浴灭酶 10 min，离心去除沉淀后得到桑叶蛋白酶解液。用超滤膜分离出 3 种不同分子量(Mw)的桑叶蛋白肽(<3 kDa、3~10 kDa、>10 kDa)，冷冻干燥备用。

此外，参照王伟强等[16]的方法稍作修改测定不同超滤组分的肽含量占比。取适量浓度的样品溶液与等体积浓度 10% 的三氯乙酸溶液混合，静置反应 10 min。离心，取 3 mL 上清液，加入 2 mL 双缩脲试剂，混合后静置 20 min，再次离心，使用酶标仪在 540 nm 处测量上清液的 OD 值。同时，使用 5% 的三氯乙酸溶液配制 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mg/mL 的 Gly-Gly-Tyr-Arg 四肽标准溶液，绘制标准曲线，得标准曲线方程为 y=0.1129x+0.0411，R^2=0.9956，对照标准曲线计算样品溶液中多肽的浓度，进而计算出样品中的肽含量占比。

1.2.2　α-葡萄糖苷酶抑制活性测定　参照先前的方法[4]，依次向 96 孔板中加入 100 μL 的多肽溶液和 50 μL 浓度 700 U/mL 的 α-葡萄糖苷酶，在 37 ℃ 培养箱中孵育 20 min 后，加入 50 μL 浓度为 10 mmol/L 的 PNPG，继续置入 37 ℃ 培养箱中孵育 20 min，最后，加入 50 μL 浓度 0.67 mol/L 的 Na_2CO_3 溶液终止反应。使用酶标仪在 405 nm 处测量反应液的 OD 值，α-葡萄糖苷酶抑制率的计算公式如下：

$$\alpha\text{-葡萄糖苷酶抑制率}(\%)=\frac{(A_c-A_b)-(A_s-A_n)}{(A_c-A_b)}\times 100$$

式中：A_s：100 μL 肽+50 μL 酶+50 μL PNPG+50 μL Na_2CO_3；A_n：100 μL 肽+50 μL PBS+50 μL PNPG+50 μL Na_2CO_3；A_c：100 μL PBS+50 μL 酶+50 μL PNPG+50 μL Na_2CO_3；A_b：100 μL PBS+50 μL PBS+50 μL PNPG+50 μL Na_2CO_3。

1.2.3　肽组分鉴定　参照先前的方法，使用 LC-MS/MS 设备对 Mw<3 kDa 的桑叶肽组分进行鉴定和分析[4]。

LC 条件：A 液为 0.1% 甲酸水溶液，B 液为 0.1% 甲酸-乙腈溶液，其中乙腈为 84%。色谱柱以 95% 的 A 液平衡，上样至 Trap column RP-C18(100 μm×2 cm, 5 μm)，经 C18 型分析柱(75 μm×10 cm, 3 μm)分离，流速为 300 nL/min，洗脱时间 30 min。

MS 条件：Q Exactive 质谱仪用于质谱分析，时长 60 min。检测方式为正离子，母离子扫描范围 m/z 为 300~1600，质谱扫描方式为信息依赖的采集工作模式下，每次全扫描后采集最强的 20 个碎片图谱，碎裂方式：高能碰撞解离，归一化碰撞能量 28，动态排除时间 25 s。MS1 在 m/z 为 200 时的分辨率为 70000，自动增益控制目标设置为 1×10^6，最大注射时间 40 ms，MS2 分辨率设置为 17500，自动增益控制目标设置为 1×10^5，最大注射时间 50 ms。Proteome Discoverer1.4 软件与 Uniprot 数据库用于肽的查库鉴定和比对。

1.2.4　生物信息学分析　采用 Innovagen(http://pepcalc.com/ppc.php)工具在线预测多肽在中性条件下的电荷和其他理化特性。PepDraw(https://pepdraw.com/)用于评估鉴定肽的疏水性；使用 ToxinPred 在线工具(https://webs.iiitd.edu.in/raghava/toxinpred/multi_submit.php)预测多肽的安全性。采用 Expasy 系统(https://web.expasy.org/protparam/)评估鉴定肽的不稳定指数，instability index>40 的肽为不稳定性肽。基于 BIOPEP 和 EROP-Moscow 等生物活性肽数据库评估肽的新颖性。

1.2.5　新型肽的合成　新型肽 ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 委托上海生工生物工程股份有限公司采用固相法进行合成，纯度高于 95%。

1.2.6　结构鉴定　参照 Wang 等[17−18]的方法稍作修改，鉴定多肽的二级结构。将 1 mg 多肽与 100 mg 的 KBr 混合，研磨并压制成 1~2 mm 厚的薄片。使用傅里叶变换红外光谱仪在 4000~400 cm^{-1} 的范围内扫描制备样品的红外光谱。使用 PeakFit v4.12 软件对图进行分析处理，根据光谱中各子峰与二级结构对应的积分面积计算多肽二级结构的相对含量。

1.2.7　体外消化稳定性　参照朱巧楠等[19]的方法，配制两份 0.4 mg/mL 的样品肽溶液，调节 pH 至 2.0，加入胃蛋白酶(2%)，置入 37 ℃ 恒温培养箱中振荡培养 2 h，得到两份胃消化产物。取其中一份胃消化产物，调节 pH 至 7.0，加入胰蛋白酶(2%)，置入 37 ℃ 恒温培养箱中振荡培养 2 h 得到肠消化阶段产物。将两个阶段的消化产物进行灭酶处理(90 ℃, 10 min)，冷却至室温后评价其 α-葡萄糖苷酶抑制活性的变化。

1.2.8　分子对接　参照 Wang 等[20]的方法稍作修改。使用 ChemBioDraw Ultra 14.0 绘制肽的结构，将其置于 ChemBio3D Ultra 14.0 进行能量最小化，Minimum RMS Gradient 设置为：0.001，保存为.mol2 格式[21]；将优化后的肽分子导置入 AutodockTools-1.5.6 中进行加氢原子、计算电荷、分配电荷、设置可旋转键等操作对其结构进行优化，保存为“.pdbqt”格式。同时，从 PDB 数据库下载 α-葡萄糖苷酶的 3D 结构(PDB ID: 3WY1)，分别使用 Pymol2.3.0 和 AutoDocktools(v1.5.6)去除蛋白结晶水、原始配体加氢，进行计算电荷、分配电荷、指定原子类型后，存为“.pdbqt”格式。紧接着，使用 POCASA 1.1 预测 α-葡萄糖苷酶的结合位点，采用 AutoDock Vina1.1.2 进行分子对接，3WY1 相关参数设置为：center_x=−2.3, center_y=−16.3, center_z=17.3；搜索空间为：

size_x: 60, size_y: 60, size_z: 60(每个格点的间距为 0.375 Å), exhaustiveness: 10。最后, 利用 PyMOL 2.3.0 和 Ligplot V2.2.9 分析复合物间的相互作用模式。

1.2.9 网络药理学分析

1.2.9.1 肽对糖尿病潜在作用靶点预测 使用 BIOPEP-UWM 数据库中的 SMILE 模块将多肽转化为 Smile 格式, 通过 Swiss Targetprediction(http://www.swisstargetprediction.ch/)、SuperPred(https://prediction.charite.de/)检索肽 ANSTGSRL、LAKLLHSK 的所有靶点, 将得到的靶点经 Uniprot(https://www.uniprot.org/)数据校准后, 得到肽的标准化作用靶点。在 GeneCards(https://www.genecards.org/)和 OMIM(https://www.omim.org/)数据库中分别输入关键词“Diabetes”进行检索, 整合得到所有的靶点基因, 经 Uniprot 数据库进行校正后, 确定为糖尿病的靶点基因信息[22]。最后, 将肽的标准化作用靶点与糖尿病的靶点基因相互映射, 作 Venn 图, 从而获得多肽治疗糖尿病的潜在作用靶点。然后, 使用 Cytoscape3.8.2 软件构建“药物-作用靶点”网络。

1.2.9.2 PPI 网络构建 为了进一步研究多肽治疗降血糖的蛋白与蛋白之间的相互作用, 将多肽治疗糖尿病的潜在作用靶点导入数据库 String(https://string-db.org/), 物种设置为“Homo sapiens”, 置信度设置为 0.7, 结果储存为 TSV 格式, 将 TSV 文件导入 Cytoscape 3.8.2 中, 构建出蛋白与蛋白相互作用网络(PPI 网络), 并对 PPI 网络进行分析, 节点大小和颜色反映 Degree 的大小, 节点越大 Degree值越大, 说明靶点基因在网络中越重要[23]。

1.2.9.3 GO 分析及 KEGG 通路富集分析 通过 DAVID 数据库(https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp)对多肽治疗糖尿病的潜在作用靶点基因进行 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析[24]。根据显著性大小(P<0.01), 选取 GO 功能分析中的生物过程(Biological Process, BP)、细胞成分(Cellular Component, CC)、分子功能(Molecular Function, MF)条目中的前 10 条, KEGG 通路条目中与降血糖有关的前 20 条通路作为多肽治疗降血糖的主要基因功能富集过程和信号通路, 预测多肽治疗降血糖的作用机制。

1.3 数据处理

每组实验均重复 3 次, 结果以“平均值±标准差”表示, 通过非线性回归分析拟合曲线计算样品肽抑制 α-葡萄糖苷酶活性的 IC_{50} 值。采用 IBM SPSS 25.0 软件进行 Duncan's 方差分析, P<0.05 表示差异显著; Origin 2019b 用于图表绘制。

2 结果与分析

2.1 桑叶超滤肽的 α-葡萄糖苷酶抑制活性

桑叶蛋白经胃蛋白酶消化和超滤后得到不同分离组分肽。本研究测定了不同分离组分桑叶超滤肽的肽含量及其 α-葡萄糖苷酶抑制活性, 结果见图 1。由图 1A 可知, Mw>10 kDa、Mw: 3~10 kDa 和 Mw<3 kDa 三种超滤组分肽的肽含量占比分别为 19.31%、34.66% 和 64.78%, 各组间差异显著(P<0.05)。其中, 桑叶蛋白酶解液组分肽的肽含量主要集中于 Mw<3 kDa 组分, 这与徐紫琪等[5] 的研究结果类似。这说明超滤可对桑叶蛋白酶解液中不同分子量大小的肽段进行有效分离, 富集出高活性的低分子量肽[4]。下一步可通过体外实验测定不同超滤组分肽的生物活性。

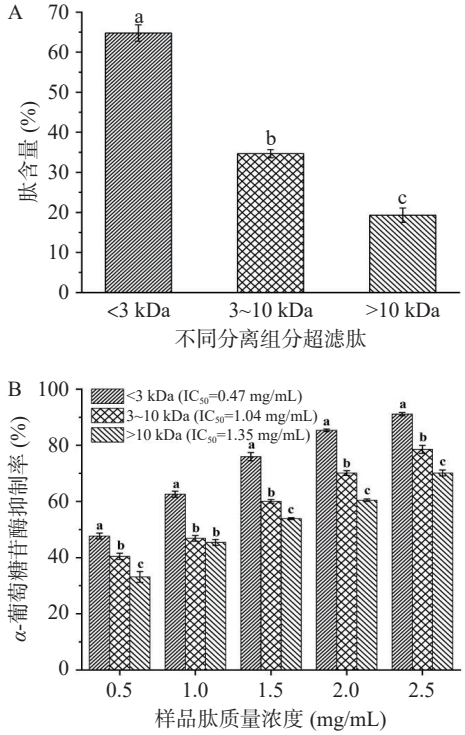


图 1 桑叶超滤肽的肽含量和 α-葡萄糖苷酶抑制活性

Fig.1 Peptide content and α-glucosidase inhibitory activity of ultrafiltration peptides from mulberry leaves

注: 不同小写字母表示同一浓度条件下, 不同组分间活性差异显著(P<0.05)。

由图 1B 所示, 不同分离组分桑叶肽的 α-葡萄糖苷酶抑制率随着其浓度的增加而逐渐增强。各浓度条件下, Mw<3 kDa 组分肽的生物活性最强, 其抑制 α-葡萄糖苷酶的 IC_{50} 值为 0.47 mg/mL, 活性显著强于 Mw>10 kDa(IC_{50}=1.35 mg/mL)和 Mw: 3~10 kDa (IC_{50}=1.04 mg/mL)组分肽(P<0.05)。在 2 mg/mL 时, Mw<3 kDa 组分肽的 α-葡萄糖苷酶抑制率(85.36%)明显强于桂花籽超滤肽(67.34%)[25]。曹天丽等[7] 探究了不同蛋白酶酶解对桑叶蛋白酶解物降血糖活性的影响, 发现中性蛋白酶酶解物对 α-葡萄糖苷酶抑制效果最佳, 其 IC_{50}=3.52 mg/mL, 活性低于本研究结果。因此, Mw<3 kDa 组分肽具有较强的 α-葡萄糖苷酶抑制活性, 可对其进一步鉴定分析。

2.2 桑叶肽的鉴定和新型肽的筛选

2.2.1 质谱鉴定 通过 LC-MS/MS 鉴定了桑叶肽的氨基酸组成序列, 总离子色谱图见图 2A。由表 1 可

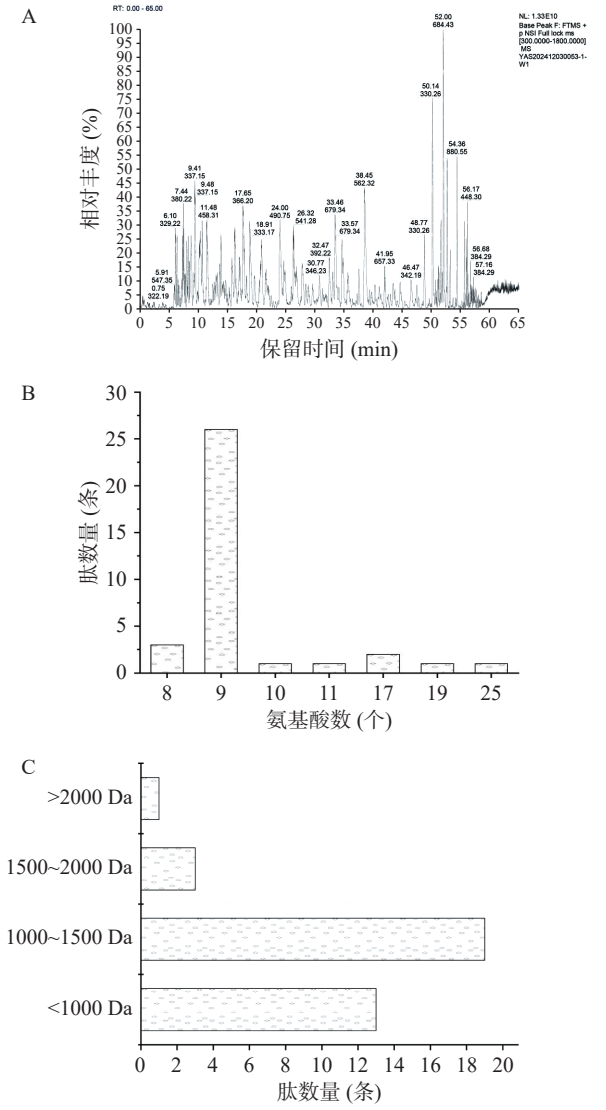


图 2　桑叶肽的鉴定与分析

Fig.2　Identification and analysis of mulberry leaf peptides

注: A-总离子色谱图; B-肽的氨基酸个数分布; C-肽的分子量分布。

知, 本研究共鉴定到 35 条肽段, 这些肽的氨基酸数目主要分布在 8 和 9 个之间(图 2B), 分子量主要集中在 1500 Da 以下(图 2C)。肽的分子量和长度对其生物活性起着至关重要的作用。之前的研究表明, 大多数分子量低于 1500 Da, 含有 2~9 个氨基酸的短肽不仅容易吸收, 还可能具有比其他长肽更强的抗氧化和其他生物活性[26−27]。这说明, 本研究中的鉴定肽可能具有潜在的生物活性。

2.2.2　新型 α-葡萄糖苷酶抑制肽的筛选　肽的生物活性与其氨基酸组成、链长和理化性质等密切相关。丝氨酸 S-(Ser)、苏氨酸 T-(Thr)、酪氨酸 Y-(Tyr)、精氨酸 R-(Arg)、赖氨酸 K-(Lys)和蛋氨酸 M-(Met)、亮氨酸 L-(Leu)、异亮氨酸 I-(Ile)、丙氨酸 A-(Ala)和脯氨酸 P-(Pro)等是构成 α-葡萄糖苷酶抑制肽的重要氨基酸残基[4]。具有较强 α-葡萄糖苷酶抑制活性的肽序列分子量低于 1000 Da、氨基酸数目在 4~8 之间[1,18]。α-葡萄糖苷酶抑制肽的净电荷范围在 −4~+3, 高活性多肽电荷值为 0 或+1, 当肽的电荷处于−4 或+3 时, 过高的电荷会大幅削弱肽的功能活性[28]。

综合上述 α-葡萄糖苷酶抑制肽的链长、特征性氨基酸占比和高活性肽的电荷值等指标筛选新型的 α-葡萄糖苷酶抑制肽。由表 2 可知, 在本研究中, 仅有 ANSTGSRL、LGKAVKPK 和 LAKLLHSK 三条肽满足链长 4~8, 分子量低于 1000 Da 的筛选条件。其中, ANSTGSRL 富含 A、S、S、L、R、T 等特征性氨基酸, 占比为 75%; LGKAVKPK 富含 L、A、P、K、K 等特征性氨基酸, 占比为 62.50%; LAKLLHSK 富含 L、A、L、L、S、K 等特征性氨基酸, 占比为 75%。经计算机在线预测发现 3 条肽都易溶于水、无毒且稳定性高(Instability index<40), 具有较好的应用潜能。最后, 通过比对电荷值发现, LGKAVKPK 所带

表 1　桑叶多肽的氨基酸序列鉴定

Table 1　Amino acid sequence identification of mulberry leaf peptides

序号	肽序列	分子量(Da)	氨基酸数(个)	亲本蛋白	相对丰度值
1	ANSTGSRL	804.41	8	烯酰辅酶A水合酶	2.71E+07
2	LGKAVKPK	839.56	8	MYB转录因子30	1.50E+07
3	KGAAAEGMK	861.44	9	MTP7蛋白	1.46E+07
4	KSTTGDGLK	905.48	9	查尔酮合酶	7.69E+07
5	LAKLLHSK	908.58	8	糖基转移酶	2.45E+09
6	CKVGAPAAR	928.49	9	烯酰辅酶A水合酶	1.11E+08
7	IVSASQDGR	931.47	9	G 蛋白亚基β1样	1.90E+07
8	QSGSNPTKK	945.49	9	MYB转录因子30	2.19E+07
9	LTATEAVEK	960.51	9	烯酰辅酶A水合酶	2.45E+08
10	SLPERSGLK	985.56	9	MYB转录因子30	6.32E+07
11	GVAYSNYSK	987.47	9	HMA8蛋白	3.99E+07
12	VNPGNFADR	988.47	9	4-羟基-3-甲基丁-2-烯基二磷酸还原酶	5.26E+07
13	MGSLSFLEK	1010.51	9	糖基转移酶	4.28E+07
14	QNLPAPKPR	1019.59	9	R2R3-MYB转录因子	3.25E+07
15	DTDILAAFR	1020.52	9	核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶	1.92E+07
16	NYPKPGLKK	1043.61	9	叶腹-背轴发育蛋白	1.26E+07

续表 1

序号	肽序列	分子量(Da)	氨基酸数(个)	亲本蛋白	相对丰度值
17	MSVAELKER	1061.55	9	G蛋白亚基β1样	1.01E+07
18	IPLVAVAEPR	1063.64	10	黄烷酮-3-羟化酶	3.65E+07
19	NDDHVVLVR	1065.56	9	14-3-3蛋白	7.51E+07
20	IWAFGGHRR	1098.58	9	G蛋白亚基β1样	2.43E+09
21	FEFEAMDTL	1101.47	9	核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶	1.69E+07
22	LEQQLESEK	1102.55	9	叶腹-背轴发育蛋白	3.24E+07
23	EEEMAFLSR	1110.50	9	叶腹-背轴发育蛋白	8.34E+06
24	VMRRNSISR	1117.61	9	NPR蛋白	1.26E+07
25	MGRKPCCSK	1122.51	9	MYB转录因子30	8.77E+06
26	LTRAEDYFK	1141.58	9	NPR蛋白	6.72E+07
27	RICEKSLIK	1145.66	9	查尔酮合酶	4.07E+06
28	LGKWWEVFK	1191.64	9	叶腹-背轴发育蛋白	3.35E+07
29	LESYEYIRR	1227.62	9	黄烷酮-3-羟化酶	1.06E+07
30	WANWEFHLK	1229.60	9	胺氧化酶	8.28E+05
31	EITLGFVDLLR	1274.72	11	核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶	1.70E+07
32	VGQVLPSHGHVIGNIIK	1767.02	17	壳酶蛋白	2.15E+08
33	NLVTVVAAGEDLTVEER	1813.94	17	14-3-3蛋白	2.07E+07
34	DPLLGEASMSLAMAGDDLR	1960.92	19	NPR蛋白	6.72E+07
35	VAYNEFSTEIPVISLAGIDEVEGRR	2763.41	25	黄烷酮3-羟化酶	3.01E+07

表 2 潜在生物活性肽的理化特性

Table 2 Physicochemical properties of potentially bioactive peptides

肽序列	分子量(Da)	链长	水溶性	特征性氨基酸	不稳定指数	电荷(pH=7)	毒性	疏水性(kcal/mol)
ANSTGSRL	804.41	8	易溶	A、S、S、L、R、T	22.21	1	无毒	+12.13
LGKAVKPK	839.56	8	易溶	L、A、P、K、K	−14.89	3	无毒	+16.38
LAKLLHSK	908.58	8	易溶	L、A、L、L、S、K	−1.86	2.1	无毒	+13.04

电荷为高电荷(+3), ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 所带电荷为低电荷。考虑到过高的电荷可能会削弱肽的功能活性[28], 进一步筛选出 ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 两条可能具有较强 α-葡萄糖苷酶抑制活性的新型肽, 经 BIOPEP 和 MBPDB 数据库检索, 两条肽的生物活性未被研究报道。

2.3 肽的合成与结构解析

进一步合成并测定了 ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 两条肽的二级结构, 结果见图 3 和图 4。由图 3A 和图 3C 可知, 经 HPLC 检测, 两条肽的杂峰少, ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 分别在保留时间为 11.797 和 12.942 min, 纯度分别为 96.89% 和 99.26%, 高于 95%。通过图 3B 和图 3D 的质谱分析可知, ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 的分子量测定值为 804.80 Da 和 909 Da, 与 2.2.2 部分表 2 中的理论值接近, 这说明肽的固相合成结果可靠。

肽的生物活性和稳定性与其二级结构密切相关。基于傅里叶红外光谱进一步测定和表征了新型肽 ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 的二级结构, 结果见图 4。图 4A 显示, 两条肽的红外特征峰的峰形相似, 在酰胺 A 带(3443 cm^{-1})、酰胺 I 带(1656 cm^{-1})和酰胺 II 带(1544 cm^{-1})都出现明显的 O-H、N-H、C=O 和 C-N 的特征吸收峰, 在 2920 cm^{-1} 处出现了 C-H 伸缩振动特征峰, 在 1206 cm^{-1} 和 1144 cm^{-1} 处出现 C-O、C-N 伸缩振动的特征吸收峰[29]。其中, 3443 cm^{-1} 处的吸收峰是 O-H 和 N-H 伸缩振动的混合吸收峰, 表明 ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 的分子之间主要以氢键相互作用进行稳定连接[17]。

酰胺 I 带(1600~1700 cm^{-1})与肽链骨架的有序程度紧密相关, 对于研究二级结构最有价值[18]。使用 Peakfit v4.12 软件拟合并利用相对面积计算了 ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 二级结构相对含量。由图 4B 可知, ANSTGSRL 由 30.65%α-螺旋、38.89% β-折叠、17.87%β-转角和 12.59% 无规则卷曲结构组成。LAKLLHSK 的拟合结果显示 α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规则卷曲的相对含量分别为 21.45%、52.82%、9.38% 和 16.34%(图 4C)。具备较高 β-折叠结构的肽, 其结构更加有秩序和规律性, 稳定性和降血糖活性也较好[30]; 拥有高含量的 α-螺旋和无规则卷曲结构的肽, 抗氧化活性及其稳定性较差[17]。在本研究中, 相比于 ANSTGSRL, LAKLLHSK 具有较低含量的 α-螺旋和无规则卷曲结构, 含更高含量的 β-折叠结构。这表明, LAKLLHSK 的 α-葡萄糖苷酶抑制活性及其稳定性可能优于 ANSTGSRL。

2.4 新型肽的 α-葡萄糖苷酶抑制活性和胃肠消化稳定性

进一步探究了新型肽的 α-葡萄糖苷酶抑制活性和胃肠消化稳定性, 结果见图 5 和图 6。

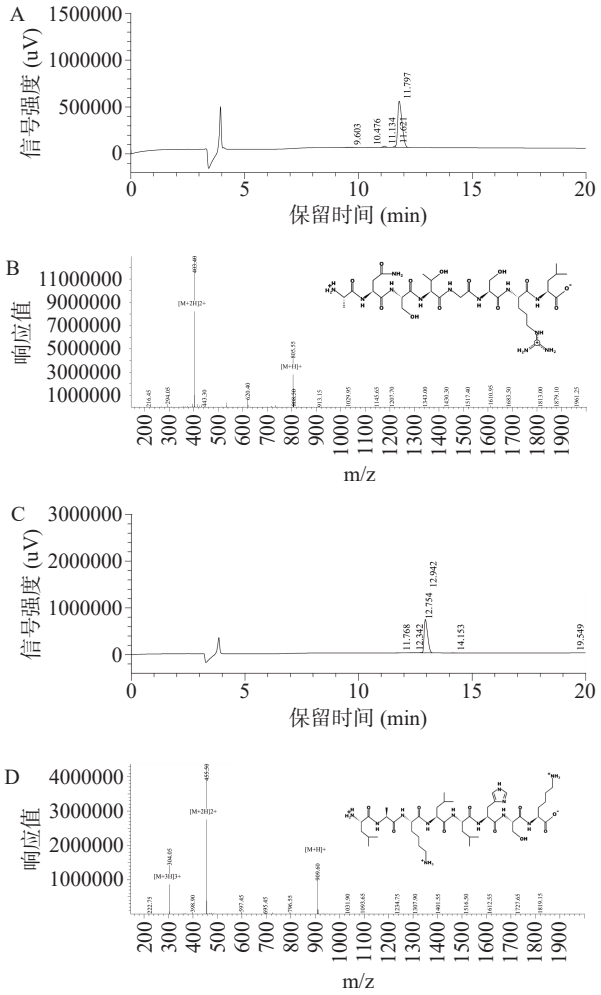


图 3　新型肽的 HPLC 纯度图和质谱图

Fig.3　HPLC purity map and mass spectra of the novel peptides

注：A 和 C 分别为合成肽 ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 的 HPLC 纯度鉴定图，B 和 D 分别为合成肽 ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 的质谱图。

2.4.1　α-葡萄糖苷酶抑制活性　由图 5 可见，ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 都具有较强的 α-葡萄糖苷酶抑制活性，两条肽的酶抑制活性与质量浓度呈良好的线性关系。0.5 mg/mL 时，ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 的 α-葡萄糖苷酶抑制率分别为 77.07% 和 95.41%，高于 1 mg/mL 的降血糖肽 YPIW（64.50%）[31]。此外，本研究中新型肽 LAKLLHSK（IC_{50}=0.183 mg/mL）和 ANSTGSRL（IC_{50}=0.314 mg/mL）的 α-葡萄糖苷酶抑制活性明显强于普洱茶肽 AADTDYRFS（IC_{50}=0.820 mg/mL）、AGDGTPYVR（IC_{50}=3.942 mg/mL）和黑豆肽 NNNPFKF（IC_{50}=4.20 mg/mL）、RADLPGVK（IC_{50}=2.83 mg/mL）和 FLKEAFGV（IC_{50}=1.32 mg/mL）[20,32]。研究发现，序列中含有大量氨基酸残基 L、C 末端存在 R 或 K、N 末端残基为 L 的肽序列具有更强的 α-葡萄糖苷酶抑制活性[28]，这可能是 LAKLLHSK 生物活性强于 ANSTGSRL 和以上其他 α-葡萄糖苷酶抑制肽的原因。

2.4.2　胃肠消化稳定性　基于 DFBP 数据库（http://www.cqudfbp.net/enzymes/hydrolysis_tools/InputServlet）初步预测了两条新型肽的抗消化特性，经计算机模拟消化后，ANSTGSRL 被分解为 ANSTGSR

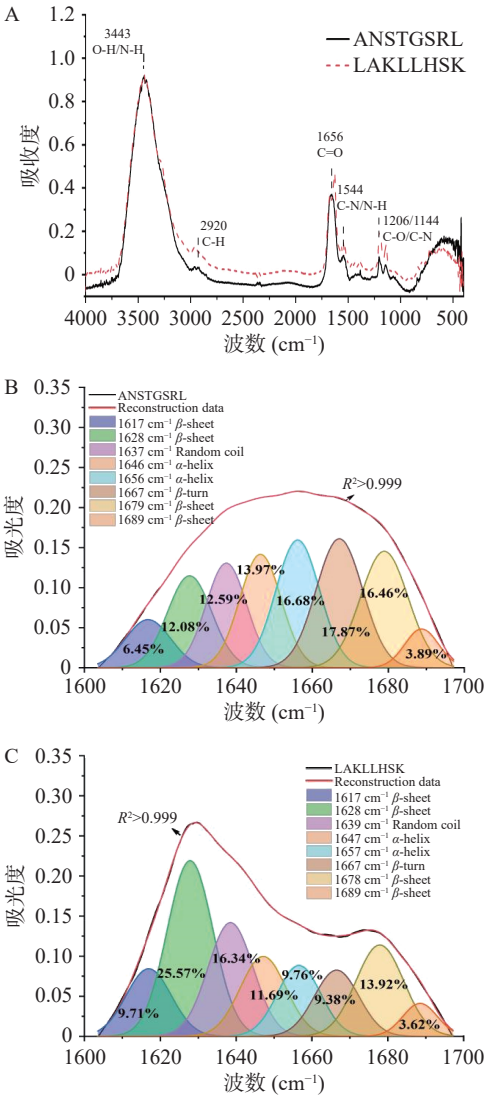


图 4　新型肽的傅里叶红外光谱图和二级结构含量

Fig.4　Fourier infrared spectrograms and secondary structure content of novel peptides

注：α-helix、β-sheet、β-turn 和 Random 分别为 α-螺旋，β-折叠、β-转角和无规则卷曲。

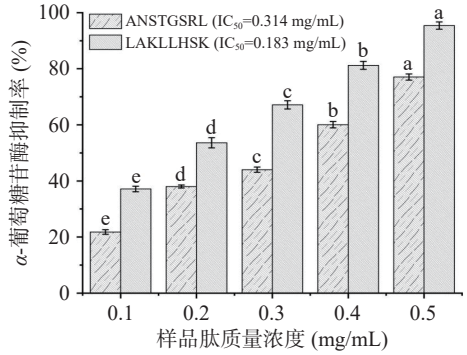


图 5　合成肽的 α-葡萄糖苷酶抑制活性

Fig.5　α-Glucosidase inhibitory activity of synthetic peptides

注：不同小写字母表示同一组分不同浓度条件下活性差异显著（P<0.05）；图 6 同。

和 L 两个片段，LAKLLHSK 被分解为 L、AK、L、LHSK 共 4 个片段。ANSTGSR 的消化片段中存在特征性氨基酸 L，片段 ANSTGSR 的 C 末端暴露出氨基酸残基 R；LAKLLHSK 的消化片段中存在特征性氨基酸 L，AK 和 LHSK 的 C 末端未氨基酸残基 K；这些特性表明，胃肠消化可能有助于增强两条肽的 α-葡萄糖苷酶抑制活性[28]。对此，基于体外模拟胃肠消化实验继续测定了两条新型肽的胃肠耐受性，结果见图 6。

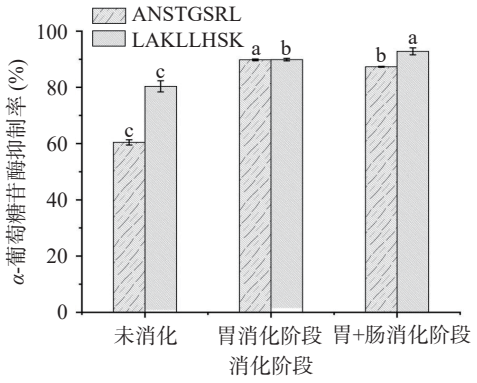


图 6 胃肠消化对新型肽生物活性的影响

Fig.6 Effect of gastrointestinal digestion on the bioactivity of novel peptides

由图 6 可知，胃肠消化有助于释放两条肽的 α-葡萄糖苷酶抑制活性，这与计算机模拟消化分析结果类似。胃肠消化前后，新型肽 ANSTGSR 生物活性的变化程度高于 LAKLLHSK，ANSTGSR 的 α-葡萄糖苷酶抑制活性由 60.44% 显著提升至 87.32%，LAKLLHSK 的酶抑制活性由 80.36% 显著提升至 92.80%（P<0.05）。这与王子俊等[33] 的研究结果相似，他们认为胃肠消化能够提高牦牛骨胶原蛋白肽抗氧化活性，可能是因为消化酶将肽水解成更小分子的片段，从而暴露出肽更多的活性基团。因此，胃肠消化有助于释放两条新型肽的 α-葡萄糖苷酶抑制活性。

2.5 分子对接模拟解析新型肽的潜在作用机理

分子对接技术可用于解析小分子生物活性肽与受体蛋白之间的相互作用机理，结合能越低，意味着受体蛋白与肽的相互作用越强、复合物间结合越稳定[34]。新型肽 ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 与 α-葡萄糖苷酶之间的分子对接结果见图 7。其中，ANSTGSRL、LAKLLHSK 与 α-葡萄糖苷酶之间的结合能分别为−6.5 kcal/mol 和−6.2 kcal/mol，结合能皆低于 0，表明两条肽都能自发地与 α-葡萄糖苷酶结合形成稳定紧密的复合物[35]。

图 7 显示了肽与 α-葡萄糖苷酶分子的相互作用模式，两条肽主要通过氢键和疏水相互作用与 α-葡萄糖苷酶结合。由图 7A 可知，ANSTGSRL 通过支链残基 Leu8、Ser3、Ala1、Thr4 与 α-葡萄糖苷酶的残基 Lys398（3.20 Å）、Ala229（3.36 Å）、Glu396（3.36 Å）、Glu231（3.08 Å）、Val335（3.40 Å）之间形

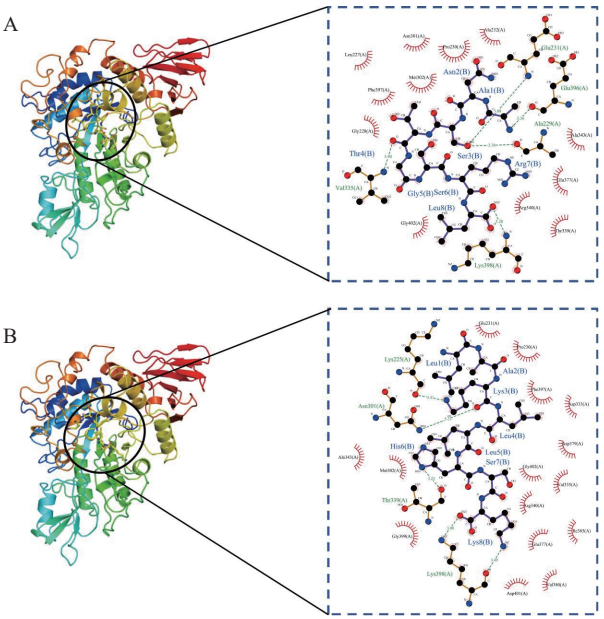


图 7 新型肽与 α-葡萄糖苷酶分子的相互作用

Fig.7 Interaction of novel peptides with α-glucosidase molecules

注：A 和 B 分别为 ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 与 α-葡萄糖苷酶分子对接得到的最佳构象图；图中绿色虚线代表氢键，红色睫毛代表疏水相互作用。

成 5 个氢键，同时，ANSTGSRL 还通过疏水作用与 α-葡萄糖苷酶的氨基酸残基（Arg340、Thr339、Glu337、Ala343、Ala232、Pro230、Asn301、Met302、Phe397、Leu227、Gly228、Gly402）之间紧密结合。在图 7B 中，LAKLLHSK 的支链残基（Lys8、His6 和 Lys3）与 α-葡萄糖苷酶的氨基酸残基 Lys398、Thr339、Asn301 和 Lys225 之间形成 5 个氢键，氢键的长度分别为 3.49 Å、3.08 Å、3.23 Å、3.23 Å、3.41 Å；LAKLLHSK 还与 α-葡萄糖苷酶的氨基酸残基 Asp401、Val380、Glu377、Ile385、Arg340、Val335、Gly402、Asp379、Asp333、Phe397、Pro230、Glu231、Ala343、Met302、Gly399 间形成 15 个疏水相互作用。上述酶的结合残基中的 Val335、Val334、Pro230 和 Gly228 被报道为 α-葡萄糖苷酶的关键活性位点[36]。因此，ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 可能主要通过氢键和疏水相互作用占据 α-葡萄糖苷酶的活性残基位点 Val335、Val334、Pro230 和 Gly228，从而阻断 α-葡萄糖苷酶与底物复合物间糖基化的形成发挥血糖调节作用[2,4]。

2.6 网络药理学分析

2.6.1 ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 的抗糖尿病作用靶点预测和 PPI 网络构建 以 Probability>0 作为 Swiss Target prediction 纳入靶点的标准，通过 SuperPred 数据库检索，ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 的靶点去重后获得潜在靶点共 280 个。以 Relevance score>1 作为 GeneCards 数据库纳入疾病的靶点，通过 GeneCards、OMIM 数据库分别获得 7649、226 个靶点，取并集后共获得 7795 个与降血糖相关的靶

点，将得到的基因经 Uniprot 数据库校正。将新型 α-葡萄糖苷酶抑制肽 ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 的作用靶点与降血糖的交集靶点基因取交集后，获得 226 个降血糖与药物的交集靶点基因，为两条新型肽干预治疗糖尿病的交互靶点基因（图 8A）。

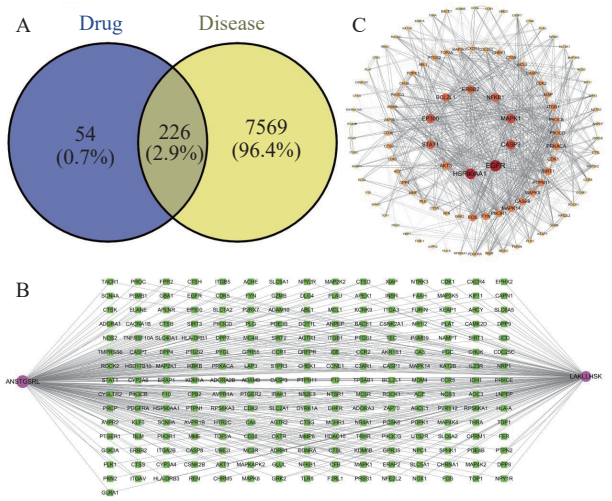


图 8　新型肽降血糖靶点基因的预测和核心靶点的 PPI 网络构建

Fig.8　Prediction of novel peptide hypoglycaemic target genes and construction of a PPI network for core targets

注：A 为多肽与降血糖靶点基因的交集靶点韦恩图，Drug-多肽 ANSTGSRL 和 LAKLLHSK，Disease-糖尿病；B 为多肽-成分-靶点预测结果图；C 为核心靶点的 PPI 网络图。

为进一步研究两条肽干预治疗糖尿病的作用机制，利用药物-成分-靶点数据，构建“network.xlsx”文件以及“type.xlsx”文件，将文件导入 Cytoscape3.7.2 进行作图，图中包括 228 个节点和 331 条边（图 8B）。将得到的 226 个交集靶点基因导入 String（https://string-db.org/）数据库中进行蛋白-蛋白相互作用预测，物种设置为：Homo Sapiens，置信度设置为：0.7。将网络文件保存为 TSV 格式，将 TSV 文件导入 Cytoscape 3.8.2 软件绘制 PPI 网络，选择 Degree 值>3 的靶点，图中包括 104 个节点和 902 条边。对网络进行拓扑分析，以 Degree 值反映靶点大小及颜色，以 combinedscore 值反映边的粗细，从而构建 PPI 网络，如图 8C 所示。其中，EGFR、HSP90AA1、MAPK1、CASP3、EP300、NFKB1、STAT1、ERBB2、BCL2L1、AKT3 为主要的核心靶点，有望在糖尿病的治疗中起关键作用[37−39]。

2.6.2　GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析　对 226 个交集靶点进行 GO 基因功能富集分析，共富集到 427 条 GO 条目，以 P<0.01 为标准筛选出新型多肽降血糖的显著富集条目涉及生物进程（BP）251 条、细胞成分（CC）56 条，分子功能（MF）120 条。最为显著的前 10 条富集分析结果见图 9A。BP 主要涉及基因表达的正调控、信号转导、对外来刺激的反应、凋亡过程的负调控、炎症反应、凋亡过程、凋亡过程的正调控、染色质重塑、细胞迁移的正调控、对缺氧

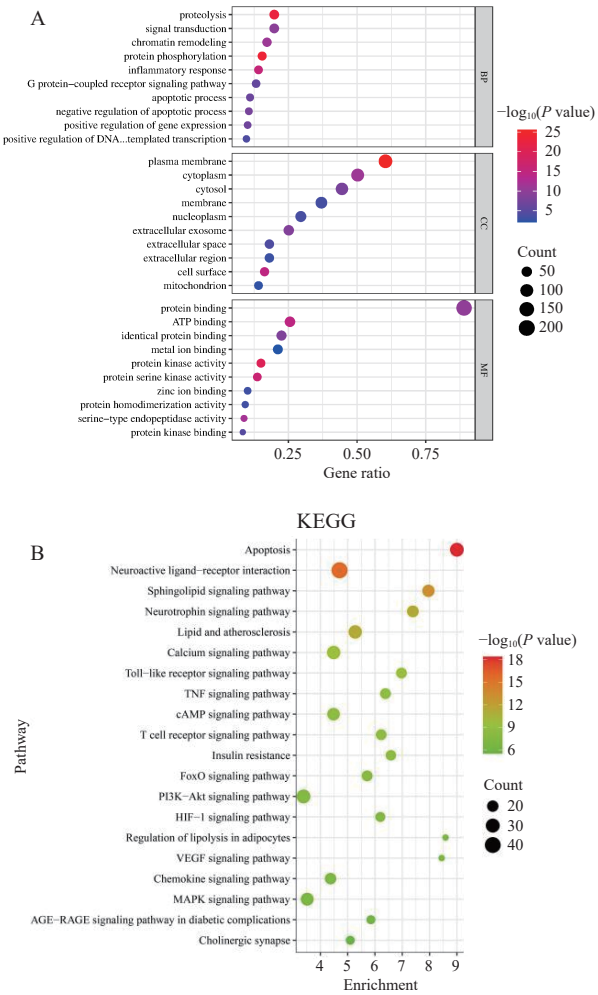


图 9　新型肽与糖尿病交集靶点的富集分析

Fig.9　Enrichment analysis of novel peptides with cross-targets in diabetes

注：图中 A 为 GO 基因功能富集，B 为 KEGG 富集。

的反应；CC 涉及细胞质、胞质、核、等离子膜、核原形质核浆、细胞外空间、细胞外区域、细胞外外泌体、含蛋白质复合物、染色质；MF 涉及蛋白质结合、相同蛋白质结合、酶结合、蛋白同分异构化活性、锌离子结合、DNA 结合、ATP 结合、DNA 结合转录因子活性、蛋白激酶结合、泛素蛋白连接酶结合。这说明 ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 可能通过干预细胞凋亡、调控转录因子和相关蛋白酶的表达等多种复杂的生物过程干预治疗糖尿病[40]。

此外，通过 KEGG 通路富集到 162 条与治疗糖尿病相关的通路，根据 P<0.01 筛选出前 20 条最为显著的关键代谢通路（图 9B）。由图 9B 可知，ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 主要通过参与细胞凋亡、神经活性配体-受体相互作用、鞘脂信号通路、神经营养素信号通路、脂质与动脉粥样硬化、钙信号通路、Toll 样受体信号通路、TNF 信号通路、cAMP 信号通路、T 细胞受体信号通路、胰岛素抵抗、FoxO 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、脂肪细胞脂解的调节、VEGF 信号通路、趋化因子信号通路、MAPK 信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE

信号通路、胆碱能突触等通路发挥抗糖尿病的作用。谢玉霞等[23] 报道，降糖肽能够缓解糖尿病引发的脂质与动脉粥样硬化和炎症相关的慢性疾病，TNF 信号通路中的 TNF-α 可通过丝氨酸磷酸化加速胰岛素抵抗，从而破坏有助于发展糖尿病的胰岛素信号。此外，cAMP 信号通路是细胞内一种重要的第二信使系统，可通过调节钙离子浓度和促进神经元的突触传递等信号传导调整机体能量代谢，间接性调节葡萄糖稳态[41]。通过阻断 AGE-RAGE 信号通路能够激活 PI3K-Akt 信号通路，增加胰岛素敏感性，从而抑制 FoxO，减少糖异生，达到调控葡萄糖代谢和防止血管内皮细胞凋亡的效果[22,40]。MAPK 信号通路是参与胰岛素非依赖性葡萄糖摄取、增强胰岛素敏感性和葡萄糖稳态的途径之一，通过上调钙信号通路可激活 MAPK 信号通路，促进糖原合成[42]。因此，上述结果表明，ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 可能通过与各种靶点的相互作用以及对多种途径的调节发挥血糖调节作用。

3 结论

本研究从桑叶蛋白酶解液中鉴定出 ANSTGSRL（IC_{50}=0.314 mg/mL）和 LAKLLHSK（IC_{50}=0.183 mg/mL）两条新型 α-葡萄糖苷酶抑制肽。两条肽的二级结构包含 α-螺旋、β-折叠、β-转角和无规则卷曲 4 种结构，相比于 ANSTGSRL，LAKLLHSK 的 α-螺旋和无规则卷曲结构含量较低，β-折叠结构含量更高。分子对接结果表明 ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 主要通过氢键和疏水相互作用占据 α-葡萄糖苷酶的活性残基位点（Val335、Val334、Pro230 和 Gly228），从而阻断 α-葡萄糖苷酶与底物复合物间糖基化的形成发挥血糖调节作用。网络药理学预测表明 ANSTGSRL 和 LAKLLHSK 主要通过与 EGFR、HSP90AA1、MAPK1、CASP3、EP300、NFKB1、STAT1、ERBB2、BCL2L1、AKT3 等关键靶点的相互作用，以及对 TNF 信号通路、cAMP 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路和胰岛素抵抗等信号通路的调节发挥血糖调节作用。本研究表明桑叶是血糖调节肽的潜在来源，可为桑叶蛋白资源的高值化利用提供新思路，未来可继续展开生物学实验，进一步验证肽的安全性和降血糖活性，助力桑叶蛋白肽产品的研发与应用。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] WEI Guangqiang, ZHAO Qiong, WANG Daodian, et al. Novel ACE inhibitory, antioxidant and α-glucosidase inhibitory peptides identified from fermented rubing cheese through peptidomic and molecular docking[J]. LWT, 2022, 159: 113196.

[2] BERRAQUERO-GARCÍA C, RIVERO-PINO F, OSPINA J L, et al. Activity, structural features and *in silico* digestion of antidiabetic peptides[J]. Food Bioscience, 2023, 55: 102954.

[3] ZHENG Kewei, WU Yuanyuan, DAI Qingfei, et al. Extraction, identification, and molecular mechanisms of α-glucosidase inhibitory peptides from defatted Antarctic krill (*Euphausia superba*) powder hydrolysates[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 266: 131126.

[4] 王道滇, 魏光强, 陶继芳, 等. 大河乌猪火腿中新型 α-葡萄糖苷酶抑制肽的分离、鉴定及活性研究[J]. 食品科学技术学报, 2024, 42(1): 114−125. [WANG Daodian, WEI Guangqiang, TAO Jifang, et al. Study on isolation, identification and activity of novel α-glucosidase inhibitory peptide derived from Dahe black pig ham[J]. Journal of Food Science and Technology, 2024, 42(1): 114−125.]

[5] 徐紫琪, 王玉珠, 魏光强, 等. 奶疙瘩抗氧化肽、α-葡萄糖苷酶抑制肽的鉴定及其稳定性分析[J]. 食品工业科技, 2025, 46(14): 1−12. [XU Ziqi, WANG Yuzhu, WEI Guangqiang, et al. Identification of antioxidant peptides and α-glucosidase inhibitory peptides from milk pimples and their stability analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(14): 1−12.]

[6] WANG Daodian, WEI Guangqiang, YANG Yanying, et al. Identification and molecular mechanism of novel bifunctional peptides from Duroc×(Landrace×Yorkshire) pig dry-cured ham: A peptidomics and *in silico* analysis[J]. Food Research International, 2024, 180: 114066.

[7] 曹天丽, 郝巨辉, 李卫东. 蛋白桑叶中蛋白质提取工艺优化及 6 种蛋白酶酶解物体外降血糖活性分析[J]. 食品工业科技, 2023, 44(12): 232−241. [CAO Tianli, HAO Juhui, LI Weidong. Optimization of protein extraction and analysis of hypoglycemic activity *in vitro* of 6 different enzymatic hydrolysates from protein mulberry leaves[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(12): 232−241.]

[8] 徐佳盈, 宫淑香, 刘岩, 等. 桑叶蛋白肽的制备及应用研究进展[J]. 蚕桑通报, 2024, 55(2): 17−21,26. [XU Jiaying, GONG Shuxiang, LIU Yan, et al. Research progress on the preparation and application of mulberry leaf protein peptides[J]. Bulletin of Sericulture, 2024, 55(2): 17−21,26.]

[9] 余刚. 桑叶蛋白酶解产物的制备及其抗氧化性能的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2020. [YU Gang. Study on the preparation of mulberry leaf proteolysis products and its antioxidant properties[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2020.]

[10] CHEN Yu, ZHANG Yu, QI Qianhui, et al. Preparation and activity evaluation of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from protein hydrolysate of mulberry leaf[J]. Frontiers in Nutrition, 2023, 9: 1064526.

[11] ZHAO Li, CHENG Xinya, SONG Xinyu, et al. Ultrasonic assisted extraction of mulberry leaf protein: Kinetic model, structural and functional properties, *in vitro* digestion[J]. Process Biochemistry, 2023, 128: 12−21.

[12] SUN Chongzhen, TANG Xin, REN Yao, et al. Novel antioxidant peptides purified from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.) leaf protein hydrolysates with hemolysis inhibition ability and cellular antioxidant activity[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(27): 7650−7659.

[13] 曹秀娟, 李带根, 曾贝贝, 等. 桑叶活性多肽的酶解工艺研究[J]. 现代食品, 2023, 29(9): 188−193. [CAO Xiujuan, LI Daigen, ZENG Beibei, et al. Study on enzymatic hydrolysis process of bioactive polypeptide from mulberry leaf[J]. Modern Food, 2023, 29(9): 188−193.]

[14] 冯雪, 王希搏, 王敦方, 等. 桑叶多肽维持动物血糖健康水平

的功能评价[J]. 中医药学报，2022，50(8)：32−35. [FENG Xue, WANG Xibo, WANG Dunfang, et al. Functional evaluation of mulberry leaf polypeptide in maintaining blood sugar health level of animals[J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2022, 50(8): 32−35.]

[15] SUN Chongzhen, WU Wenjia, YIN Zhina, et al. Effects of simulated gastrointestinal digestion on the physicochemical properties, erythrocyte haemolysis inhibitory ability and chemical antioxidant activity of mulberry leaf protein and its hydrolysates[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2018, 53(2): 282−295.

[16] 王伟强, 郑宇, 许为民, 等. 金华火腿酶解肽的制备工艺优化及理化性能表征[J]. 食品工业科技，2025，46(14)：267−278. [WANG Weiqiang, ZHENG Yu, XU Weimin, et al. Preparation process optimization and physicochemical properties characterization of Jinhua ham enzymolysis peptide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(14): 267−278.]

[17] WANG Daodian, XU Ziqi, WANG Yuzhu, et al. Identification and characterization of novel antioxidant peptides from Yunnan dry-cured beef: A combined *in silico* and *in vitro* study[J]. Food Chemistry, 2025, 477: 143485.

[18] WANG Linnan, ZHANG Fan, SUO Bingxin, et al. α-Glucosidase inhibitory peptides from the enzymolysis of Semen *Ziziphi spinosae* protein using an ultrasound-assisted protease: Preparation and inhibitory mechanism[J]. Food Research International, 2025, 208: 116282.

[19] 朱巧楠, 王鹏, 杨选, 等. 油茶饼粕抗氧化肽的鉴定及其稳定性[J]. 中国食品学报，2024，24(7)：332−341. [ZHU Qiaonan, WANG Peng, YANG Xuan, et al. Identification and stability of antioxidant peptides from *Camellia* seed cake[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(7): 332−341.]

[20] WANG Teng, BO Nianguo, SHA Gen, et al. Identification and molecular mechanism of novel hypoglycemic peptide in ripened pu-erh tea: Molecular docking, dynamic simulation, and cell experiments[J]. Food Research International, 2024, 194: 114930.

[21] 于梦怡, 刘世林, 黄志远, 等. 青刺果抗氧化肽的分离纯化、结构鉴定及其分子对接解析[J]. 食品科学技术学报，2024，42(2)：109−119. [YU Mengyi, LIU Shilin, HUANG Zhiyuan, et al. Isolation, purification, structure identification and molecular docking analysis of antioxidant peptide from *Prinsepia utilis* royle[J]. Journal of Food Science and Technology, 2024, 42(2): 109−119.]

[22] 潘若瑶, 任国艳, 马富利. 基于网络药理学及分子对接揭示芦荟大黄素的降糖机制[J]. 食品与发酵工业，2024，50(14)：69−77. [PAN Ruoyao, REN Guoyan, MA Fuli. Network pharmacology and molecular docking reveal hypoglycemic mechanism of *Aloe*-emodin[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(14): 69−77.]

[23] 谢玉霞, 葛武鹏, 李国薇, 等. 驼乳乳铁蛋白 DPP-IV 抑制肽的筛选验证及其防治糖尿病潜在作用机制探究[J]. 食品工业科技，2023，44(6)：384−395. [XIE Yuxia, GE Wupeng, LI Guowei, et al. *In silico* analysis of novel DPP-IV inhibitory peptides released from camel milk lactoferrin and the possible pathways involved in diabetes protection[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(6): 384−395.]

[24] 李婷婷, 管亚, 弘子姗, 等. 基于网络药理学及分子对接技术探讨辣木叶抗肥胖的作用机制[J]. 食品工业科技，2023，44(15)：34−45. [LI Tingting, GUAN Ya, HONG Zishan, et al. Study on the anti-obesity mechanism of action of *Moringa oleifera* Lam. leaves by network-based pharmacology and molecular docking techniques[J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(15): 34−45.]

[25] DU Junhui, YANG Dongmei, GUAN Tongtong, et al. Activity and mechanism of α-glucosidase inhibitory peptides released from *Osmanthus fragrans* seeds protein during the *in vitro* digestion[J]. Industrial Crops and Products, 2024, 219: 119089.

[26] CHEN Lihua, CHEN Shaohua, RONG Yuzhi, et al. Identification and evaluation of antioxidant peptides from highland barley distiller's grains protein hydrolysate assisted by molecular docking[J]. Food Chemistry, 2024, 434: 137441.

[27] ZHENG Xiuqing, CHI Hai, MA Shuang, et al. Identification of novel α-glucosidase inhibitory peptides in rice wine and their antioxidant activities using *in silico* and *in vitro* analyses[J]. LWT, 2023, 178: 114629.

[28] 李志明, 张舒, 孟维洪, 等. 食源性 α-葡萄糖苷酶抑制肽：构效关系、安全性及生物利用度研究进展[J]. 食品科学，2023，44(15)：298−309. [LI Zhiming, ZHANG Shu, MENG Weihong, et al. Food-derived α-glucosidase inhibitory peptides: Research progress on structure-activity relationship, safety and bioavailability[J]. Food Science, 2023, 44(15): 298−309.]

[29] DU Tonghao, HUANG Jinqing, XIONG Shijin, et al. Effects of enzyme treatment on the antihypertensive activity and protein structure of black sesame seed (*Sesamum indicum* L.) after fermentation pretreatment[J]. Food Chemistry, 2023, 428: 136781.

[30] WANG Xuefeng, FAN Yaozhu, XU Feiran, et al. Characterization of the structure, stability, and activity of hypoglycemic peptides from *Moringa oleifera*seed protein hydrolysates[J]. Food & Function, 2022, 13(6): 3481−3494.

[31] 陶强, 李姣, 曹皖雪, 等. 肽 Tyr-Pro-Ile-Trp(YPIW)对 α-葡萄糖苷酶的抑制机理及其稳定性[J]. 食品科学，2025，46(7)：43−50. [TAO Qiang, LI Jiao, CAO Wanxue, et al. Mechanism for the inhibition of α-glucosidase by peptide Tyr-Pro-Ile-Trp(YPIW) and its stability[J]. Food Science, 2025, 46(7): 43−50.]

[32] LI Yuancheng, WANG Xinlei, GUO Xumeng, et al. Rapid screening of the novel bioactive peptides with notable α-glucosidase inhibitory activity by UF-LC-MS/MS combined with three-AI-tool from black beans[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 266: 130982.

[33] 王子俊, 徐鹏飞, 朱天晴, 等. 牦牛骨胶原蛋白肽的抗氧化活性验证、稳定性评估及机制分析[J]. 食品与发酵工业，2025，51(19)：126−134. [WANG Zijun, XU Pengfei, ZHU Tianqing, et al. Verification of antioxidant activity, stability evaluation, and mechanism analysis of yak bone collagen peptide[J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(19): 126−134.]

[34] 何宛诗, 郑钦生, 陈小艳, 等. 雨生红球藻新型抗氧化肽的制备纯化、鉴定筛选及其对秀丽线虫抗氧化能力的影响[J]. 食品科学，2023，44(22)：116−125. [HE Wanshi, ZHENG Qinsheng, CHEN Xiaoyan, et al. Preparation, purification and identification of a novel antioxidant peptide from *Haematococcus pluvialis* and its effect on the antioxidant capacity of *Caenorhabditis* elegans[J]. Food Science, 2023, 44(22): 116−125.]

[35] 周岚, 李宏彬, 孙嫚, 等. 黑豆蛋白 α-葡萄糖苷酶抑制肽的制备及功能特性分析[J]. 食品工业科技，2025，46(24)：389−397. [ZHOU Lan, LI Hongbin, SUN Man, et al. Preparation and functional characteristics analysis of black bean protein α-glucosidase inhibition peptide[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(24): 389−397.]

[36] WANG Xiang, DENG Yejun, ZHANG Yang, et al. Screen-

ing and evaluation of novel *α*-glucosidase inhibitory peptides from *Ginkgo biloba* seed cake based on molecular docking combined with molecular dynamics simulation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(27): 10326−10337.

[37] XIE Yuxia, WANG Ju, WANG Shuangshuang, et al. Preparation, characterization, and mechanism of DPP-IV inhibitory peptides derived from Bactrian camel milk[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 277: 134232.

[38] GANEKAL P, VASTRAD B, KAVATAGIMATH S, et al. Bioinformatics and next-generation data analysis for identification of genes and molecular pathways involved in subjects with diabetes and obesity[J]. Medicina, 2023, 59(2): 309.

[39] 张彦, 闫平, 张华, 等. 基于生物网络分析研究柑橘属果皮辅助预防 2 型糖尿病作用[J]. 食品工业科技, 2024, 45(5): 319−330. [ZHANG Yan, YAN Ping, ZHANG Hua, et al. Adjuvant prevention of type 2 diabetes of *Citrus peel* based on bionetwork analysis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(5): 319−330.]

[40] 刘欣慧, 赵悦, 褚天旭, 等. 欧李原花青素通过 PI3K-Akt-GSK-3*β* 信号通路改善 HepG2 细胞胰岛素抵抗[J]. 食品工业科技 , 2025, 46(8): 382−390. [LIU Xinhui, ZHAO Yue, CHU Tianxu, et al. *Cerasus humilis* proanthocyanidins ameliorats insulin resistance through PI3K-Akt-GSK-3*β* signaling pathway in HepG2 cells[J]. Science and Technology of Food Industry, 2025, 46(8): 382−390.]

[41] 安惠, 朱小利, 魏昭晖, 等. 基于 cAMP/PKA 信号通路探讨红芪多糖影响糖尿病胃轻瘫大鼠钙稳态和能量代谢的作用机制[J]. 中药药理与临床, 2024, 40(8): 56−60. [AN Hui, ZHU Xiaoli, WEI Zhaohui, et al. Hongqi polysaccharide regulates calcium homeostasis and energy metabolism in rat model of diabetic gastroparesis via cAMP/PKA signaling pathway[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 2024, 40(8): 56−60.]

[42] JAHANDIDEH F, WU J P. A review on mechanisms of action of bioactive peptides against glucose intolerance and insulin resistance[J]. Food Science and Human Wellness, 2022, 11(6): 1441−1454.